12-11

High Fidelity RT-PCR kit

ReverTra -Plus-™

(Code No. PCR-501)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A3297K

－目次－

[1] はじめに…… (2)
[2] RT-PCR 法の原理…… (3)
[3] キットに含まれているもの…… (4)
[4] ご用意いただくもの…… (6)
[5] プロトコール…… (7)
[6] 添付プライマーの説明…… (9)
[7] RNA を取り扱う際の注意…… (10)
[8] RT-PCR を行う際の注意…… (10)
[9] トラブルシューティング…… (11)
[10] 参考文献…… (12)
[11] 関連商品…… (13)

ご注意

本キットに含まれる試薬類はすべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

[1] はじめに

近年、ゲノムプロジェクト等により、数多くの遺伝子の塩基配列が解明されてきました。しかしながら、その遺伝子の多くは依然機能が十分解明されていません。これらの遺伝子の機能を解析していく手法として、cDNA アレイを用いた発現解析のような網羅的なアプローチが用いられる一方、個々の遺伝子をクローニングし、機能解析を行うといった常套的なアプローチも重要です。また、クローニングされた遺伝子は、医学・創薬への応用が期待されます。

現在、遺伝子クローニングの多くに、RT-PCR 法が用いられています。RT-PCR は RNA から cDNA を合成する逆転写反応と、この cDNA を増幅する PCR から構成されています。この PCR にて誤ったDNA配列が増幅された場合、目的遺伝子が本来有しているはずの機能を損なう危険性があります。

そこで、弊社では、RNA から効率的に cDNA を合成する逆転写酵素“ReverTra Ace® ”と、High-Fidelity PCR 酵素の中でも特に正確性が高い“KOD -Plus-”を組み合わせて、正確に効率よく遺伝子を増幅できる High Fidelity RT-PCR キット **“ReverTra -Plus-™”** を開発いたしました。

本製品には、以下の特徴があります。

1. 高い cDNA 合成能

   本製品は、逆転写酵素として、M-MLV(Molony Murine Leukemia Virus)由来の逆転写酵素を遺伝子工学的手法を用いて改変し、長鎖の cDNA 合成を妨げる RNase H 活性を欠失させ、cDNA 合成能を大幅に向上させた改良型酵素 ReverTra Ace®を使用しています。ヒト遺伝子由来 14 kb 以上の cDNA 合成を確認しています。

2. 高い正確性、高い反応性

   High-Fidelity PCR 用酵素としてご好評いただいている Hot Start PCR 酵素の KOD -Plus-を使用しています。更に、今回、新たに本キット用に PCR buffer を改良しました*。これにより、ヒト遺伝子をターゲットにした RT-PCR で 10 kb 以上の増幅が可能になりました。 *Patent pending

製品検定: HeLa total RNA 1 μg から、DNA Polymerase ε 遺伝子 6.8 kb の増幅を確認しています。

[2] RT-PCR 法の原理

RT-PCR 法は、図 1 のように、鋳型 RNA から First strand cDNA を合成する逆転写反応(Reverse Transcription ; RT)のステップと、この cDNA を鋳型として Second strand cDNA を合成し、さらに目的の遺伝子断片を増幅する PCR のステップからなります。

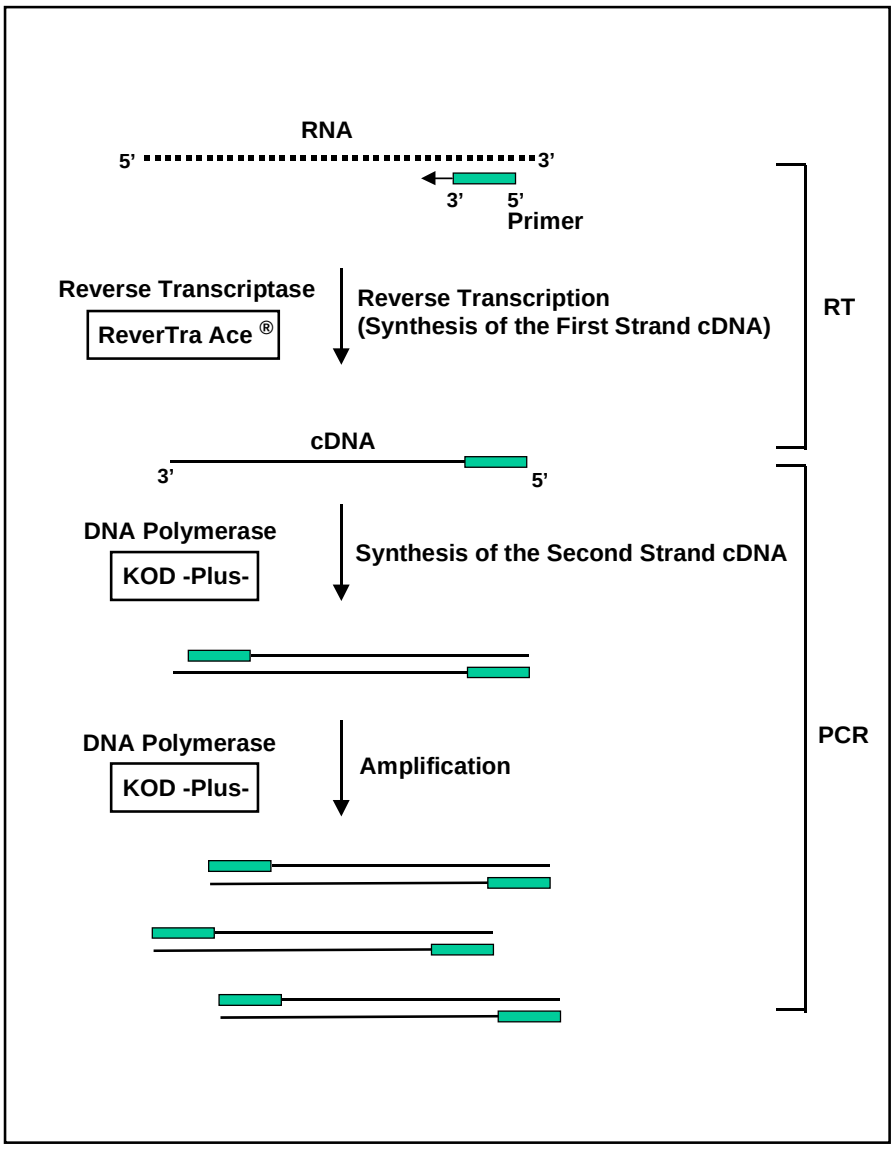

図 1 . RT-PCR 法の原理

[3] キットに含まれているもの（-20℃保存）

ﾊﾟｰﾂ No		PCR-501 (100 回用)
1	ReverTra Ace®	100 μl
2	RNase Inhibitor	100 μl
3	5×RT Buffer (25 mM $MgCl_2$ 含有)	400 μl
4	10 mM dNTPs	300 μl
5	RNase Free H_2O	1200 μl
6	Oligo(dT)20 (10 pmol/μl)	500 μl
7	Random Primer (25 pmol/μl)	100 μl
8	Control Primer F (10 pmol/μl)	50 μl
9	Control Primer R (10 pmol/μl)	50 μl
10	Positive Control RNA (10^5 copies/μl)	50 μl
11	KOD -Plus-	100 μl
12	10×PCR Buffer for ReverTra -Plus-	500 μl
13	25 mM $MgSO_4$	500 μl

【各プライマーのシークエンス】

Oligo(dT)20

5’-$(dT)_{20}$-3’

Random Primer

5’-$(dN)_9$-3’

Control Primer F (G3PDH)＊

5’-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3’ (20 mer)

Control Primer R (G3PDH)＊

5’-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3’ (20 mer)

【添付プライマー】

G3PDH 遺伝子は” Housekeeping Gene”であり、添付の配列特異的プライマー（Control Primer F, R）にて 450b の PCR 産物が増幅します。このプライマーは、Human 由来の遺伝子のほか、Rat, Mouse, Swine 由来のものにもご利用いただけます。 このほか、Oligo(dT)20、Random Primer を添付しています。これらのプライマーの選定については、後述の「添付プライマーの説明」(p.9)をご参照ください。

＊ このプライマーセットを用いた場合、cDNA から得られる増幅産物と同じサイズの増幅産物がゲノム DNA より得られる場合があります。これはおそらくシュードジーンに由来するものと思われます。このため、RT-PCR を行う際には、RT 反応を行わないネガティブコントロールを取ることをおすすめいたします。

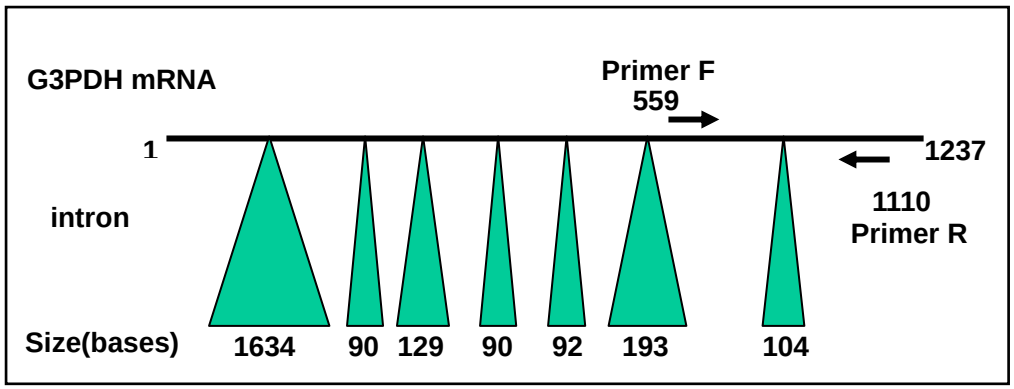

図 2 Control Primer F, R のロケーション

【Positive Control RNA】

本キットはポジティブコントロール RNA として、Human G3PDH (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase)遺伝子の *in vitro* 転写産物を添付しています（3'末端に 22 mer の Poly(A) tail が付加されています）（図 3 参照）。

G3PDH 遺伝子は、様々な哺乳類の組織で発現している"Housekeeping Gene"です。その mRNA 発現レベルは、一部のサイトカインや Tumor-promoting Phorbol Esters 等を含む誘導物質によっても影響を受けず、また、ほとんどの組織で一定していることが知られています。したがって、種々の組織から抽出した RNA サンプルをご利用いただく際に、最適なコントロールとしてご使用いただけます。

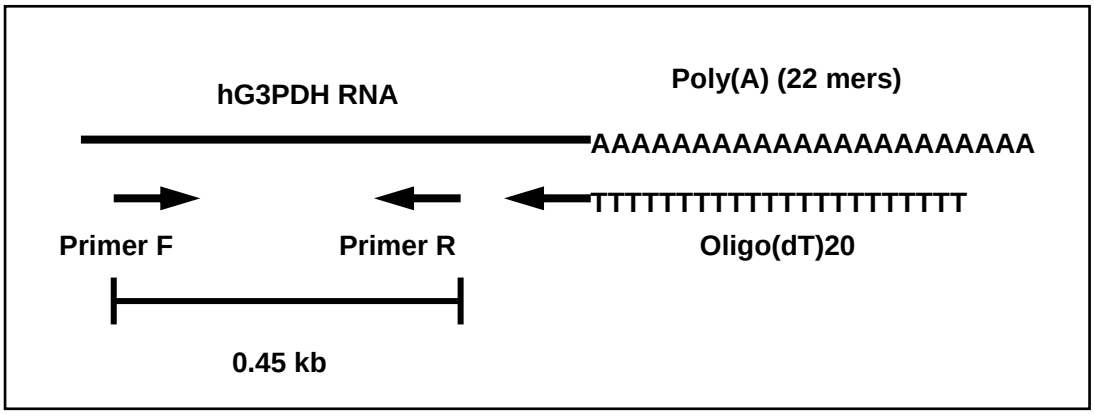

図 3 ポジティブコントロール RNA と添付プライマー

[4] ご用意いただくもの

RT-PCR を行う際には、本キットのほかに以下のものが必要となります。

1. 試薬
   - ・ミネラルオイル（必要に応じて）
   - ・電気泳動用ゲル
   - ・電気泳動用バッファー
   - ・DNA サイズマーカー
   - ・滅菌蒸留水（PCR グレード）

2. 機器・器具
   - ・サーマルサイクラー
   - ・ゲル電気泳動装置
   - ・UV トランスイルミネーター及び撮影装置
   - ・マイクロ遠心機
   - ・PCR 用チューブ

[5] プロトコール

1. 逆転写反応

① PCR 用チューブに以下のように反応溶液を調製し、RNA を熱変性させます。

RNase Free H_2O		X μl
Primer		
Oligo(dT)20	(10 pmol/μl)	5 μl
Random Primer*	(25 pmol/μl)	あるいは 1 μl
配列特異的下流プライマー**	(10 pmol/μl)	あるいは 1 μl
		いずれか 1 種を選択
RNA		
Total RNA	:1 μg 以下	
mRNA	:10～100 ng	いずれかY μl
Positive Control RNA	:10^5 copies(1 μl)	
Total Volume		12 μl

② 65℃、5 分間の熱処理を行った後、直ちに氷上に移して急冷します。
③ 以下のように、②に各試薬溶液を添加します。

（熱変性済み RNA）	12 μl
5×RT Buffer	4 μl
10 mM dNTPs	2 μl
RNase Inhibitor	1 μl
ReverTra Ace®***	1 μl
Total Volume	20 μl

④サーマルサイクラーにセットし、「（30℃、10 分）* → 42℃、60 分 → 85℃、5 分*** → （4℃、Hold）」の反応を行います。

【注】

* Random Primer をご使用の場合は、十分にアニーリングできるように、30℃、10 分間のプレインキュベーションを行ってください。

** テンプレート RNA として Positive Control RNA を用いる場合は Control Primer R をご使用いただけます。

*** 逆転写酵素は反応後に cDNA に結合しているため、85℃、5 分間の熱処理を行います。必要以上に逆転写酵素を添加した場合、熱処理が不十分となり、PCR 反応を阻害することがあります。必ず本キット添付の ReverTra Ace®を 1 μl ご使用ください。

2. PCR 反応

PCR 用チューブに以下のように反応液を調製し、PCR 反応を行います。

滅菌蒸留水	35 μl
10×PCR Buffer	5 μl
25 mM $MgSO_4$	3 μl
10 mM dNTPs	1 μl
配列特異的上流プライマー（10 pmol/μl）	1.5 μl
配列特異的下流プライマー（10 pmol/μl）	1.5 μl
KOD -Plus-	1 μl
(1.逆転写反応の)サンプル cDNA	2 μl
Total Volume	50 μl

（標準的な条件）*1

94℃	2 min		
98℃	10 sec	←	30 サイクル
(Tm-5)℃*2	30 sec		（25～40 サイクル）
68℃	1 min /kb	←	
4℃	Hold		

【注】

*1 Tm の高い（72℃以上）プライマーを用いた PCR でエキストラバンドが認められた場合は、下記の 2 ステップあるいはステップダウンのサイクルをお試しください。

①2 ステップ

94℃	2 min		
98℃	10 sec	←	25～40
68℃	1 min /kb	←	サイクル
4℃	Hold		

②ステップダウン

94℃	2 min		
98℃	10 sec	←	5 サイクル
74℃	1 min /kb	←	
98℃	10 sec	←	5 サイクル
72℃	1 min /kb	←	
98℃	10 sec	←	5 サイクル
70℃	1 min /kb	←	
98℃	10 sec	←	25 サイクル
68℃	1 min /kb	←	
68℃	7 min		
4℃	Hold		

*2 Control Primer を使用する場合はアニーリング温度を 60℃に設定してください。

[6]添付プライマーの説明

逆転写反応のプライマー選択の際には、以下の選択基準を参考にしてください。

1. 配列特異的下流プライマー（Control Primer R）
   一般に、鋳型 RNA と相補的な配列を持つプライマーを用いる場合、ターゲットのシークエンスが分かっている必要があります。

2. Oligo(dT)20
   Poly(A) tail を有する mRNA の逆転写反応にのみご使用いただけます。原核生物の RNA、真核生物の rRNA や tRNA 等にはご使用いただけません。

3. Random Primer
   Poly(A) tail の有無を問わず、一般的にご使用いただけます。Random Primer で逆転写反応を行った場合、いかなるペアの配列特異的なプライマーによってもPCR を行うことができます。
   Random Primer で逆転写反応を行う際には、プライマーが十分アニーリングできるように 30℃、10 分間のプレインキュベートを行ってください。

[7] RNA を取り扱う際の注意

1. RNase の混入をおさえる

RT-PCR 法では、RNase の作用を抑えることが重要です。そのため、使用器具および試薬類からの RNase の混入を防ぐとともに、純度の高い RNA サンプルを得ることが重要です。さらに、実験環境にご注意いただきますとともに、唾液、汗等からの RNase の混入を防ぐため、マスク、手袋の着用をお薦めします。

2. 器具類について

実験器具は可能な限り、ディスポーザブルタイプのプラスチック製品をオートクレーブ滅菌してご使用ください。ガラス器具をご使用になる際には、乾熱滅菌するか、もしくは 0.1% Diethylpyrocarbonate (DEPC)溶液に 37℃、12 時間浸せきした後、オートクレーブ（121℃、30 分間）をかけたものをご使用ください。

[8] RT-PCR を行う際の注意

本製品は鋳型として、Total RNA、tRNA、mRNA、rRNA に対応できるように設計されておりますが、いずれの場合でも目的の増幅産物を効率良く得るために、純度の高い RNA サンプルをご使用になることをお薦めします。

弊社 MagExtractor^{TM} -RNA- (Code No. NPK-201F)を用いますと、高純度の Total RNA を短時間で簡便に調製することができます。

[9] トラブルシューティング

1．増幅産物のバンドを確認できない、または増幅効率が悪い

原因		対策
鋳型 RNA	・純度が悪い	・再調製する
	・鋳型量が少ない	・鋳型量を増やす ・PCR のサイクル数を増やす
	・劣化している	・再調製する ・使用頻度が高い場合は、あらかじめ少量ずつ分注しておく
	・高次構造を有する	・RT に Random Primer を使用する ・酵素以外を入れた RT 反応液を 65℃で5min 加熱後、そのまま 42℃へ移し、酵素を添加して RT 反応を行う
プライマー	・Tm 値が低い	・アニーリング温度を下げる ・プライマーを再設計する
	・配列が適切でない	・Poly(A) tail を持たない RNA を鋳型とする場合、Oligo(dT)20 は使用できない ・配列が正しいことを確認する ・プライマー内、或いはプライマー間に相補的な領域がないことを確認する ・PCR プライマー対が同一鎖にアニーリングしないことを確認する
	・プライマー量が少ない	・それぞれの RT primer にあった適正量を使用する
PCR 条件	・Mg 濃度が低い	・Mg 濃度を上げる (例えば 2mM)
	・アニーリング温度が高い	・アニーリング温度を下げる (2～5℃)
	・伸長時間が短い	・伸長時間を 1min/kb で設定する
	・サーマルサイクラーの動作が適切でない	・動作が正常であるかを確認する
その他	・RNase のコンタミネーション	・Control RNA で確認する ・鋳型 RNA を再調製する ・鋳型 RNA の変性の際に予め RNase Inhibitor を添加する ・新しい試薬を使用する
	・逆転写酵素量が多い	・1 反応当り、添付の ReverTra Ace®を 1 μl 使用する
	・酵素の失活	・Control RNA で確認する ・新しい試薬を使用する

2. 非特異的なバンドが多い

原因		対策
鋳型 RNA	・鋳型量が多すぎる	・鋳型量を減らす
	・ゲノム DNA のコンタミネーション	・逆転写反応を行っていない Negative Control RNA も同時に PCR を行う ・DNase I 処理を行う
プライマー	・他にプライマーがアニーリングし易い領域がある	・プライマーを再設計する
	・プライマーが適量でない	・プライマー量を検討する
PCR 条件	・Mg 濃度が高い	・Mg 濃度を下げる (例えば 1mM)
	・アニーリング温度が低い	・アニーリング温度を上げる (2～5℃) ・2ステップ、ステップダウン PCR を検討する
その他	・サンプル間のコンタミネーション	・チップをこまめに交換する ・フィルターチップを用いる ・RT-PCR 反応液を調製する器具と電気泳動を行う器具を区別する ・RT-PCR 反応液を調製する場所と電気泳動を行う場所を区別する

[10] 参考文献

1. Takagi, M., Nishioka, M., Kakihara, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4504-4510 (1997)
2. Hashimoto, H., Matsumoto, T., Nishioka, M., Yuasa, T., Takeuchi, S., Inoue, T., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., and Kai, Y., *J. Biochem.* Tokyo, **125**, 983-986 (1999)
3. Mizuguchi, H., Nakatsuji, M., Fujiwara, S., Takagi, M., and Imanaka, T., *J. Biochem.* Tokyo, **126**, 762-768 (1999)
4. Nishioka, M., Mizuguchi, H., Fujiwara, S., Komatsubara, S., Kitabayashi, M., Uemura, H., Takagi, M., and Imanaka, T., *J. Biotechnol*., **88**, 141-149 (2001)
5. Hashimoto, H., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., Inoue, T.,and Kai, Y., *J. Mol. Biol.*, **306**, 469-77 (2001)
6. Imanaka, T. and Takagi, M., *J. Clin. Inst. Chem. Engrs*, **32**, 277-288 (2001)

[11] 関連商品

品名	内容	Code No.
ReverTra Ace -α-® （RT-PCR 用 cDNA 合成キット）	100 回用	FSK-101
ReverTra Ace® （高性能逆転写酵素）	10,000 U×1 本 (10,000 U×1 本)×5 (10,000 U×1 本)×10	TRT-101 TRT-101X5 TRT-101X10
KOD -Plus-	200U×1 本 (200U×1 本)×5 (200U×1 本)×10	KOD-201 KOD-201X5 KOD-201X10
KOD -Plus- Ver.2	200U×1 本 (200U×1 本)×5	KOD-211 KOD-211X5
KOD -Plus- Neo	200U×1 本 (200U×1 本)×5 (200U×1 本)×10	KOD-401 KOD-401X5 KOD-401X10
RNase Inhibitor, recombinant	2,500U×1 本 (2,500U×1 本)×5	SIN-201 SIN-201X5
10 mM dNTPs	各 2μmol	NTP-301
Oligo(dT)20	1 nmol	FSK-201
Random Primer	2.5 nmol	FSK-301
MagExtractor™ -RNA- （Total RNA 抽出用試薬キット）	100 回用	NPK-201F
Mag*ical Trapper* （磁性ビーズ分離用スタンド）	1 個	MGS-101
100 bp DNA ラダー	100 回用	DNA-035
200 bp DNA ラダー	100 回用	DNA-031
1 kb DNA ラダー	300 回用	DNA-032

【製造・販売元】

－納期・注文に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部　(大阪)
〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部　(東京)
〒141-8633　東京都品川区東五反田二丁目 10 番 2 号　東五反田スクエア
TEL 03-6422-4819　FAX 03-6422-4951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間　9:00～12:00 , 13:00～17:00　(土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］http://www.toyobo.co.jp/bio